

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

26.06.03

2

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2002年 6月26日

出 願 番 号
Application Number: 特願2002-185866
[ST. 10/C]: [JP2002-185866]

REC'D 15 AUG 2003

WIPO PCT

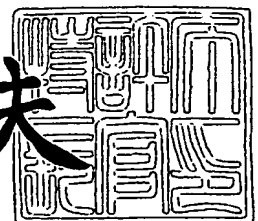
出 願 人
Applicant(s): 学校法人慶應義塾

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 7月31日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 P02-028

【提出日】 平成14年 6月26日

【特記事項】 特許法第30条第1項の規定の適用を受けようとする特許出願

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 A01K

【発明の名称】 動脈硬化または癌の予防・治療剤

【請求項の数】 3

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県横浜市港北区日吉3丁目14番1号 慶應義塾
 大学理工学部内

 【氏名】 梅澤 一夫

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都新宿区信濃町35番地 慶應義塾大学医学部内

 【氏名】 川合 陽子

【特許出願人】

 【識別番号】 899000079

 【氏名又は名称】 学校法人 慶應義塾

 【代表者】 安西 祐一郎

【代理人】

 【識別番号】 100098121

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 間山 世津子

【選任した代理人】

 【識別番号】 100107870

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 野村 健一

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 093194

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

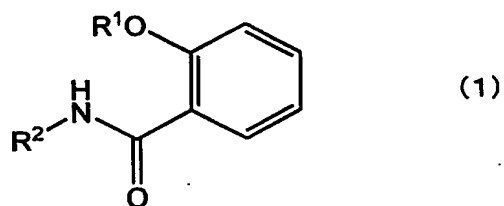
【発明の名称】 動脈硬化または癌の予防・治療剤

【特許請求の範囲】

【請求項1】 NF- κ B阻害作用を有する化合物を有効成分として含有する動脈硬化または癌の予防・治療剤。

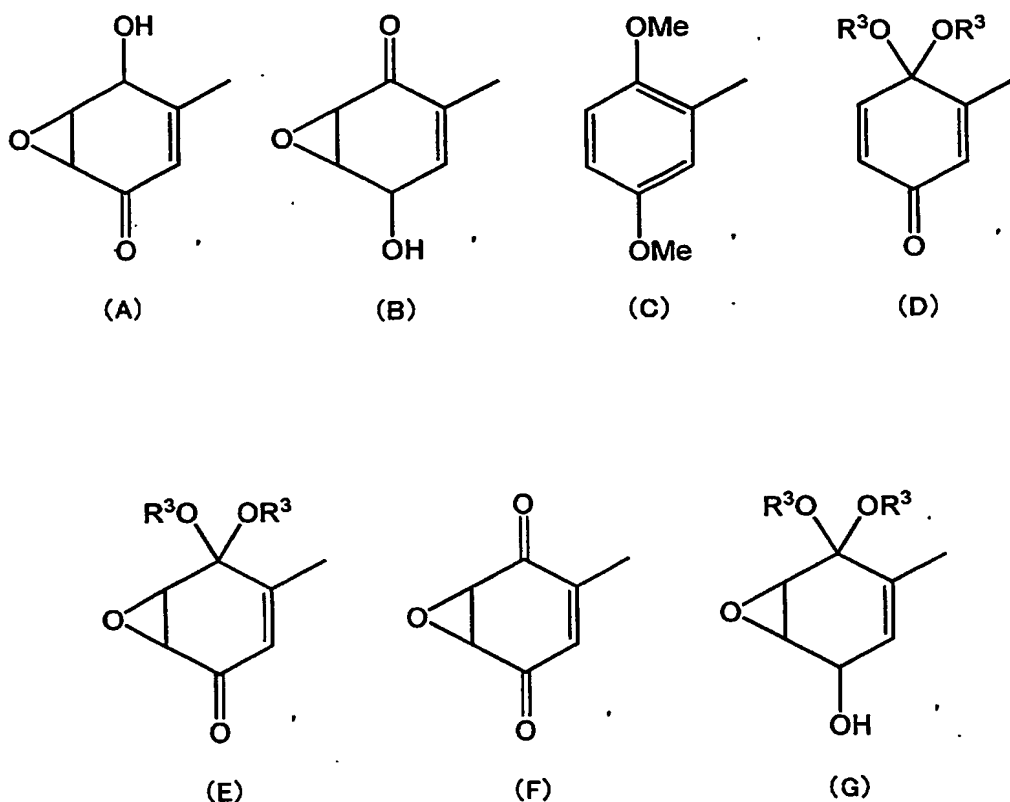
【請求項2】 NF- κ B阻害作用を有する化合物が下記の一般式(1)で表される化合物またはその薬理学的に許容される塩である請求項1記載の予防・治療剤。

【化1】



(式中、R¹は水素原子またはC2～4のアルカノイル基であり、
R²は、下記の式(A)、(B)、(C)、(D)、(E)、(F)または(G)で表される基である
)

【化2】



(式中、R³はC1～4のアルキル基である)

【請求項3】 癌の転移抑制のために用いられる請求項1または2に記載の予防・治療剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、動脈硬化または癌の予防・治療剤に関する。

【0002】

【従来の技術】

動脈硬化にはコレステロールを減少させて間接的に治療効果のあるメバロチンなどが使われているが効果が不十分である。癌細胞転移阻害剤として臨床使用されているものはまだない。金属プロテアーゼ阻害剤などが開発中であるが全く約束される状況ではない。一般的な抗癌剤が副作用が強く、使用が著しく限定されているのは周知のとおりである。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、従来の動脈硬化治療剤および抗癌剤とは異なる作用機構に基づく、新規な動脈硬化治療剤および抗癌剤を提供することを目的とする。

【0004】

【課題を解決するための手段】

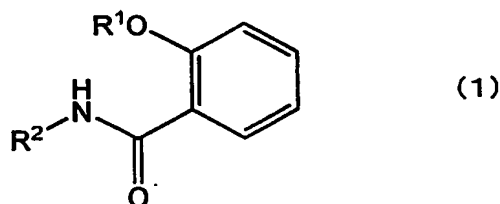
動脈硬化にも癌細胞転移にも血管内皮細胞の接着因子発現が必要であることから、本発明者らは、接着因子を発現させない薬剤を用いることで問題点を解決した。すなわち、本発明は、NF- κ B阻害作用を有する化合物を有効成分として含有する動脈硬化または癌の予防・治療剤を提供する。

【0005】

NF- κ B阻害作用を有する化合物は、下記の一般式(1)で表される化合物またはその薬理学的に許容される塩であるとよい。

【0006】

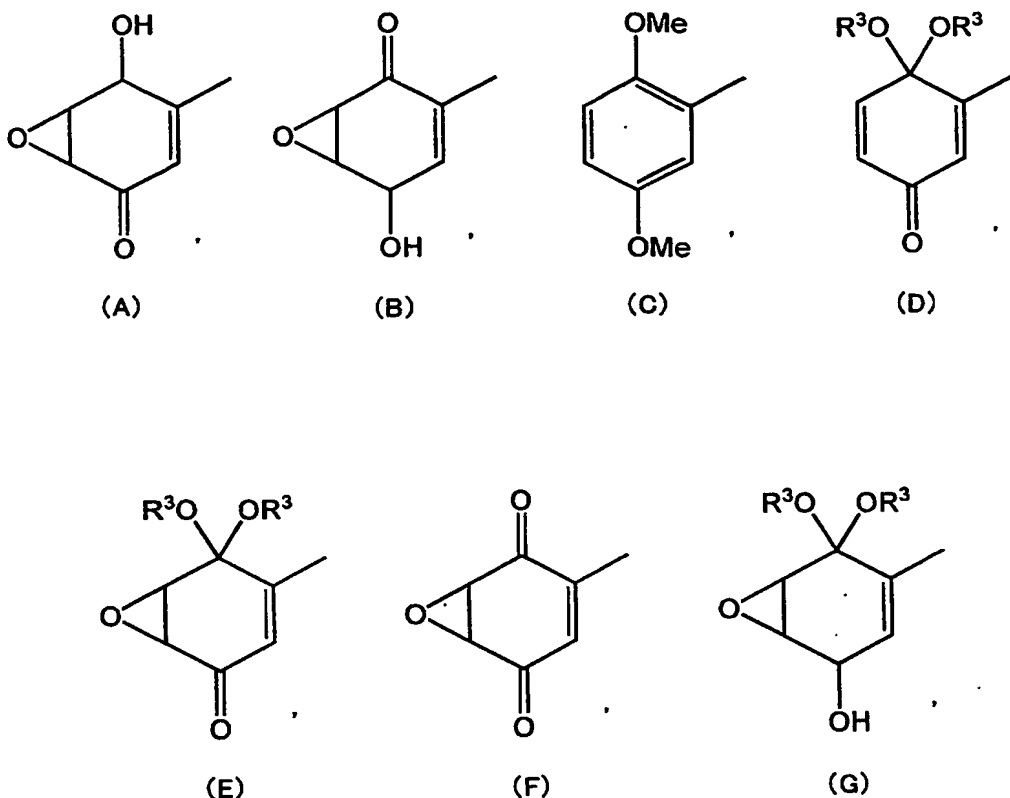
【化3】



(式中、 R^1 は水素原子またはC 2～4のアルカノイル基であり、 R^2 は、下記の式(A)、(B)、(C)、(D)、(E)、(F)または(G)で表される基である)

【0007】

【化4】



(式中、R³はC1～4のアルキル基である)

【0008】

本発明の予防・治療剤は、癌の転移抑制のために用いられてもよい。

【0009】

特定の理論に拘泥するわけではないが、NF- κ B阻害作用を有する化合物が抗動脈硬化作用、抗癌作用を有する機構を以下に説明する。

【0010】

炎症性刺激や物理的刺激などが血管内皮細胞に加わると、接着分子の発現が増強され、白血球が血管内皮細胞表面上に接着し、血管外へ移動する。また、転写因子NF- κ BはICAM-1、VCAM-1、E-selectinなどの接着分子の発現を活性化する。さらに、転移能の高い大腸癌でE-selectinのリガンドであるシアリルルイス-Xが高発現していることが報告されている。そこで、これら接着分子の発現を抑制することは動脈硬化や転移の制御につながると考えられ、NF- κ B阻害剤は有用であると考えられる。一方、本発明者らは抗生物質epoxyquinomicin Cの構造をもと

に、NF- κ B阻害剤DHMEQ（後述の化合物(1a)）をデザイン、合成した（W001/12588 A1）。そして、今回、DHMEQがヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVECs）の接着分子発現に与える影響を調べた。TNF- α によるNF- κ Bの活性化をgel shift assayにより評価したところ、I κ B α の分解を抑制することなく、抑制した。また、Western blotting法でTNF- α によって誘導されるICAM-1、VCAM-1、E-selectinの発現に与えるDHMEQの影響を調べたところ、これら接着分子の発現を抑制し、実際に白血球とHUVECsの接着、白血病細胞とHUVECsの接着も阻害した。白血球の接着は脂質の蓄積などを介して動脈硬化を誘導し、癌細胞の接着は血管からの侵出、転移を引き起こす。そこで前者は抗動脈硬化剤に、後者は癌転移抑制剤につながる効果である。以上の結果から、NF- κ B阻害作用を有する化合物は癌細胞の転移を抑制できることが示された（図1）。

【0011】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0012】

本発明は、NF- κ B阻害作用を有する化合物を有効成分として含有する動脈硬化または癌の予防・治療剤を提供する。

【0013】

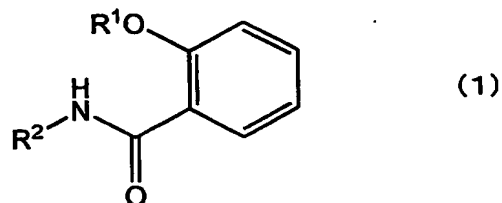
NF- κ B阻害作用を有する化合物としては、サリチル酸アミド誘導体（W001/12588 A1）、panepoxydone（Biochem. Biophys. Res. Commun. 226, 214-221, 1996）、cycloepoxydon（J. Antibiot. 51, 455-463, 1998）、SN-50（J. Biol. Chem. 270, 14255-14258）を挙げることができる。

【0014】

NF- κ B阻害作用を有するサリチル酸アミド誘導体としては、下記の一般式(1)で表される化合物またはその薬理学的に許容される塩を挙げることができる。

【0015】

【化5】



【0016】

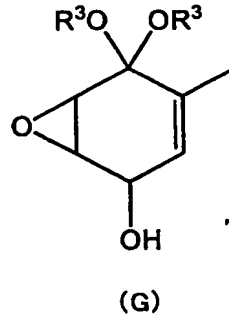
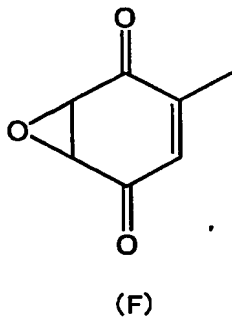
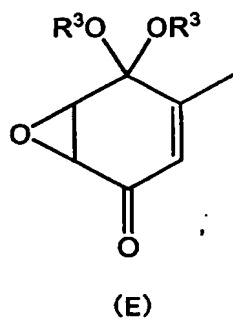
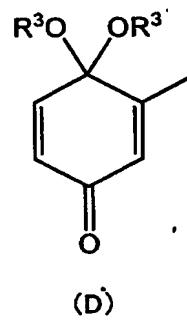
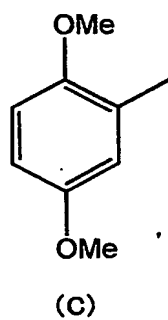
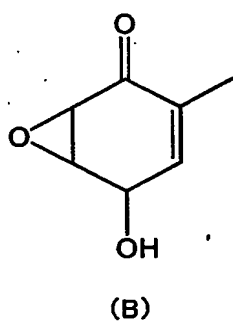
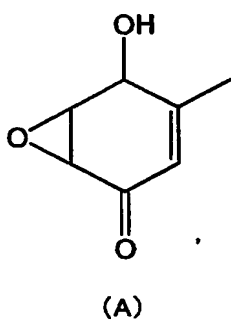
一般式(1)において、 R^1 は水素原子またはC2～4のアルカノイル基である。 R^1 のC2～4のアルカノイル基としては、アセチル、プロピオニル、ブタノイル基及びこれらの異性体基が挙げられ、アセチル基が好ましい。

【0017】

R^2 は、下記の式(A)、(B)、(C)、(D)、(E)、(F)または(G)で表される基である)

【0018】

【化6】



【0019】

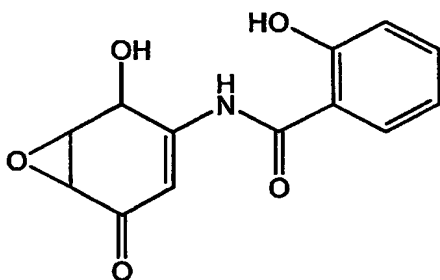
式(D)、(E)および(G)のR³はC1～4のアルキル基である。R³のC1～4のアルキル基としては、メチル、エチル、プロピル、ブチル基およびこれらの異性体基が挙げられ、メチル基、エチル基が好ましい。

【0020】

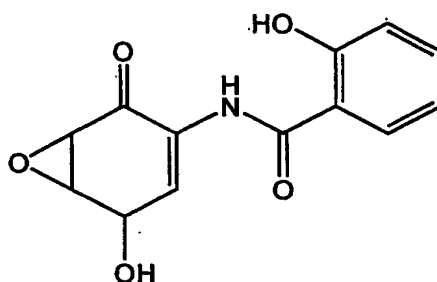
一般式(1)で表される化合物の一例を以下に示す。

【0021】

【化7】



(1a)



(1b)

【0022】

式(1a)で表される化合物 (DHMEQ) が、動脈硬化の抑制および癌の転移抑制に特に効果的である。

【0023】

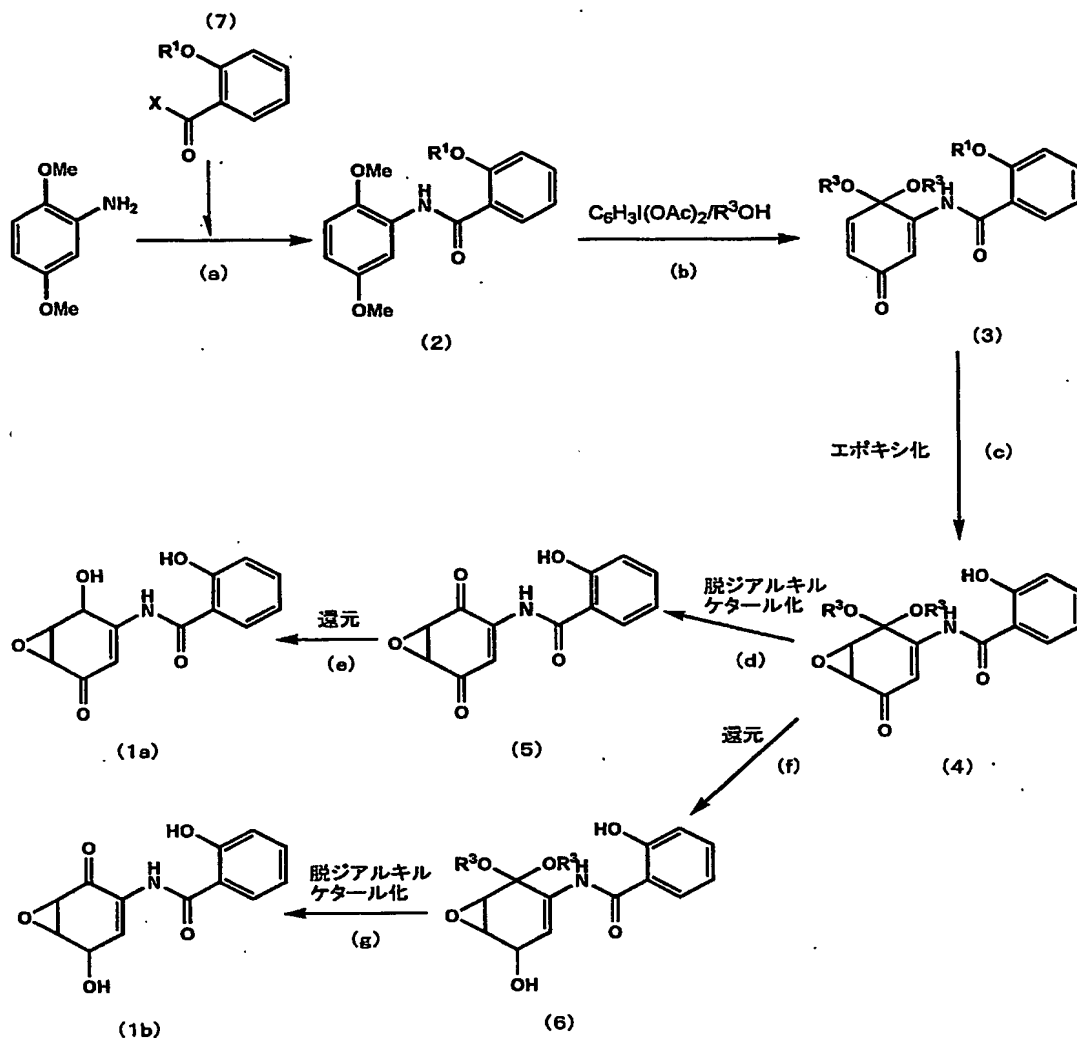
式(1)で表される化合物は、Wipfらの合成法 (Synthesis, 12号, 1549～1561頁, 1995年) に準じて製造することができる。

【0024】

式(1)で表される化合物の製造方法の一例を下記の反応工程式に基づいて説明する。

【0025】

【化 8】



【0026】

工程 a : N-(2-アルカノイルベンゾイル)-2,5-ジメトキシアニリンの調製

2,5-ジメトキシアニリンを溶媒(ピリジンなど)に溶解し、 $-78 \sim 50^\circ\text{C}$ 、好ましくは氷冷下で、式(7)のO-アルカノイルサリチロイルハライドの酢酸エチル溶液を加えて、攪拌下で反応させる。水を加えて反応を停止させた後、酢酸エチルを加え、塩酸、水、重曹水、水で順次洗浄し、乾燥後、減圧濃縮、真空乾燥することにより式(2)で示されるN-(2-アルコキシベンゾイル)-2,5-ジメトキシアニリン化合物が得られる。この化合物は精製せず、次の

工程に使用できる。

工程b: 3-(O-アルカノイルサリチロイルアミド)-4, 4-ジアルコキシ-2, 5-シクロヘキサジエノン化合物の調製

上記で得られた式(2)の化合物をメタノールなどの溶媒に溶解し、-20~50℃、好ましく氷冷下、ジアセトキシオードベンゼンを加え、室温で攪拌下反応させる。減圧濃縮後、酢酸エチルを加え、重曹水、食塩水で洗浄し、溶剤を減圧濃縮して得られた残渣をカラムクロマトグラフィーにて精製することにより、式(3)で示される3-(O-アルカノイルサリチロイルアミド)-4, 4-ジアルコキシ-2, 5-シクロヘキサジエノン化合物が得られる。

工程c: 5, 6-エポキシ-4, 4-ジアルコキシ-3-サリチロイルアミド-2-シクロヘキセノン化合物の調製

式(3)で示される3-(O-アルカノイルサリチロイルアミド)-4, 4-ジアルコキシ-2, 5-シクロヘキサジエノンを溶剤(テトラヒドロフラン、メタノールなど)に溶解し、-20~50℃、好ましくは氷冷下、過酸化水素水及び水酸化ナトリウムを加え、攪拌しながら反応させる。反応液に酢酸エチルを加え、塩酸溶液、チオ硫酸ナトリウム水溶液、食塩水で順次洗浄し、乾燥後、真空乾燥する。残存する原料化合物を除去するため、残渣をアセトンに溶解し、p-トルエンスルホン酸を加え、室温で攪拌して原料化合物を分解する。メタノールを減圧留去して得られた残渣に酢酸エチルを加え、水で洗浄する。酢酸エチル層を乾燥して得られた残留物をカラムクロマトグラフィーにて精製して式(4)で示される5, 6-エポキシ-4, 4-ジアルコキシ-3-サリチロイルアミド-2-シクロヘキセノン化合物が得られる。

工程d: 5, 6-エポキシ-2-サリチロイルアミド-2-シクロヘキセン-1, 4-ジオンの調製

式(4)の5, 6-エポキシ-4, 4-ジアルコキシ-3-サリチロイルアミド-2-シクロヘキセノン化合物を塩化メチレンに溶解し、氷冷下無機酸または有機酸(三フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体など)を加え、攪拌しながら反応させる。反応液に溶剤(酢酸エチルなど)を加え、水で洗浄し、酢酸エチル層を濃縮した後、得られた残渣をメタノールで洗浄して式(5)で示される5, 6-

エポキシ-2-サリチロイルアミド-2-シクロヘキセン-1, 4-ジオンが得られる。

工程 e: 5, 6-エポキシ-4-ヒドロキシ-3-サリチロイルアミド-2-シクロヘキセノン (1a, DHMEQ) の調製

式 (5) で示される 5, 6-エポキシ-2-サリチロイルアミド-2-シクロヘキセン-1, 4-ジオンを、溶媒 (メタノール、エタノール、THF など) に懸濁し、 $-78 \sim 50^{\circ}\text{C}$ 、好ましくは氷冷下、還元剤 (水素化ホウ素ナトリウムなど) を加え反応させる。反応液に溶剤 (酢酸エチル、塩化メチレンなど) を加え、塩酸、水で順次洗浄し、溶剤層を乾燥後、減圧濃縮して、メタノールにて懸濁攪拌洗浄して、式 (1a) で示される 5, 6-エポキシ-4-ヒドロキシ-3-サリチロイルアミド-2-シクロヘキセノン (1a, DHMEQ) が得られる。

。

工程 f: 3, 3-ジアルコキシ-4, 5-エポキシ-6-ヒドロキシ-2-サリチロイルアミドシクロヘキセンの調製

式 (4) の 5, 6-エポキシ-4, 4-ジアルコキシ-3-サリチロイルアミド-2-シクロヘキセノン化合物をメタノールなどの溶剤と重曹水混合溶媒に溶解し、 $-78 \sim 50^{\circ}\text{C}$ 、好ましくは、氷冷下、還元剤 (水素化ホウ素ナトリウムなど) を加え、攪拌下に反応させる。反応液に溶剤 (酢酸エチルなど) を加え、塩酸、水で洗浄し、溶剤層を乾燥後、減圧濃縮、真空乾燥し、カラムクロマトグラフィーなどで精製して、式 (6) で示される 3, 3-ジアルコキシ-4, 5-エポキシ-6-ヒドロキシ-2-サリチロイルアミドシクロヘキセンを得る。

工程 g: 5, 6-エポキシ-4-ヒドロキシ-2-サリチロイルアミド-2-シクロヘキセノン (1b) の調製

式 (6) で示される 3, 3-ジアルコキシ-4, 5-エポキシ-6-ヒドロキシ-2-サリチロイルアミドシクロヘキセンを溶剤 (アセトンなど) に溶解し、p-トルエンスルホン酸を加え、室温で攪拌反応させる。反応液に溶剤 (酢酸エチルなど) を加え、水で洗浄し、溶剤層を乾燥し、減圧濃縮して、精製して、式 (1b) の 5, 6-エポキシ-4-ヒドロキシ-2-サリチロイルアミド-2-シクロヘキセノン (1b) を得ることができる。

【0027】

一般式(1)で表される化合物は、弱酸性物質であり、それらの塩としては第4級アンモニウム塩などの有機塩基の塩、あるいは各種金属との塩、例えばナトリウムのようなアルカリ金属との塩があり、これらの塩の形で利用できる。これらの塩は、公知の方法で製造することができる。

【0028】

NF- κ B阻害作用を有する化合物は、動脈硬化抑制および癌転移抑制効果を有する。従って、NF- κ B阻害作用を有する化合物は、動脈硬化および癌の予防・治療剤として有用である。

【0029】

その他のNF- κ B阻害作用を有する化合物の製造方法は、以下の文献に記載されている。panepoxydoneはBiochem. Biophys. Res. Commun. 226, 214-221, 1996に記載され、cycloepoxydonはJ. Antibiot. 51, 455-463, 1998に、SN50はJ. Biol. Chem. 270, 14255-14258, 1995に記載されている。

【0030】

NF- κ B阻害作用を有する化合物は、単独で使用してもよいし、あるいは他の薬剤（例えば、他の抗動脈硬化剤、抗癌剤）と組み合わせて使用してもよい。

【0031】

NF- κ B阻害作用を有する化合物（例えば、式(1a)または(1b)で表される化合物またはその塩）をヒトに投与する場合には、例えば、成人1日あたり約1~100 mg/kg（体重）の投与量で、1回または数回に分けて経口投与するとよいが、その投与量や投与回数は、疾患の種類、症状、年齢、投与方法などにより適宜変更しうる。

【0032】

NF- κ B阻害作用を有する化合物は、薬理上許容される担体と配合し、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤などの製剤にして、経口投与してもよいし、注射剤などの製剤にして腹腔内や静脈内へ注射する、あるいは、坐薬などの製剤にして直腸内投与するような態様で非経口投与することもできる。薬理上許容される担体としては、製剤素材として慣用の各種有機あるいは無機担体物質が用

いられ、固形製剤における賦形剤、滑沢剤、結合剤、崩壊剤、液状製剤における溶剤、溶解補助剤、懸濁化剤、等張化剤、緩衝剤、無痛化剤などとして配合される。また必要に応じて、防腐剤、抗酸化剤、着色剤、甘味剤などの製剤添加物を用いることもできる。製剤中のNF- κ B阻害作用を有する化合物（有効成分）の含有率は、1～90重量%の間で変動させることができる。例えば、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤などの形態をとる場合には、有効成分を5～80重量%含有させるのが好ましい。シロップ剤などの液剤の場合には、有効成分を1～30重量%含有させるのが好ましい。さらに、非経口投与する注射剤の場合には、有効成分を1～10重量%含有させるのが好ましい。

【0033】

NF- κ B阻害作用を有する化合物の製剤化は、賦形剤（乳糖、白糖、ブドウ糖、マンニトールなどの糖類、バレイショ、コムギ、トウモロコシなどのデンプン、炭酸カルシウム、硫酸カルシウム、炭酸水素ナトリウムなどの無機物、結晶セルロースなど）、結合剤（デンプンのり液、アラビアゴム、ゼラチン、アルギン酸ナトリウム、メチルセルロース、エチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、カルメロースなど）、滑沢剤（ステアリン酸マグネシウム、タルク、水素添加植物油、マクロゴール、シリコーン油）、崩壊剤（デンプン、寒天、ゼラチン末、結晶セルロース、CMC・Na、CMC・Ca、炭酸カルシウム、炭酸水素ナトリウム、アルギン酸ナトリウムなど）、矯味矯臭剤（乳糖、白糖、ブドウ糖、マンニトール、芳香性精油類など）、溶剤（注射用水、滅菌精製水、ゴマ油、ダイズ油、トウモロコシ油、オリーブ油、綿実油など）、安定剤（窒素、二酸化炭素などの不活性ガス、EDTA、チオグリコール酸などのキレート剤、亜硫酸水素ナトリウム、チオ硫酸ナトリウム、L-アスコルビン酸、ロンガリットなどの還元物質など）、保存剤（パラオキシ安息香酸エステル、クロロブタノール、ベンジルアルコール、フェノール、塩化ベンザルコニウムなど）、界面活性剤（水素添加ヒマシ油、ポリソルベート80、20など）、緩衝剤（クエン酸、酢酸、リン酸のナトリウム塩、ホウ酸など）、希釈剤などを用いて、公知の方法で行われる。

【0034】

【実施例】

以下、本発明を実施例によって具体的に説明する。なお、これらの実施例は、本発明を説明するためのものであって、本発明の範囲を限定するものではない。

【0035】

以下の実施例で用いた式(1a)で表される化合物(DHMEQ)は、W001/12588 A1の実施例1～5に記載の方法により製造した。

【0036】

また、実施例で用いた材料とその入手先は以下の通りである。

HUVECs：慶應病院にて臍帯より調製

TNF- α ：Techne

IL-1 β ：PEPRO TECH EC LTD

LPS：Sigma

HEPES：Sigma

DTT：Merck

PMSF：Sigma

glycerol：関東化学

NaCl：関東化学

MgCl₂：関東化学

γ -³²P-ATP：Amersham

Tris-HCl：Sigma

spermidine.HCl：Sigma

EDTA：関東化学

T4 polynucleotide kinase：Takara

Nick column：Amersham

NP-40：ナカライテスク

BSA：Sigma

poly dI-dC：Amersham

抗p65抗体：Santa Cruz

acrylamide：和光

Tris-boric acid：関東化学

APS：関東化学

TEMED：関東化学

NaF：関東化学

Na₃VO₄：関東化学

NP-40：ナカライテスク

leupeptin：（財）微生物化学研究所

antipain：（財）微生物化学研究所

PMSF：Sigma

クマシーブリリアントブルー液：Bio-Rad

SDS：関東化学

2-mercaptoethanol：関東化学

PVDF膜：Amersham

skim milk：雪印

ICAM-1の抗体：Santa Cruz

VCAM-1の抗体：Santa Cruz

E-selectinの抗体：Santa Cruz

ICAM-1の2次抗体：Amersham

VCAM-1の2次抗体：Amersham

E-selectinの2次抗体：Santa Cruz

白血球：実験者の血液より調製

HL-60細胞：細胞バンクより購入

HBSS+：ニッスイより供与

合成オリゴヌクレオチド：Promegaから購入

5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3' (配列番号1)

3'-TCA ACT CCC CTG AAA GGG TCC G-5' (配列番号2)

【0037】

〔実施例1〕

gel shift assayによりNF- κ Bの活性化を調べたところ、DHMEQはHUVECsにおいてTNF- α 、IL-1 β 、LPS によるNF- κ Bの活性化を3 μ g/mlで完全に抑制した。図2にはTNF- α で刺激した時のDHMEQによる阻害効果を示す。実験方法は以下のとおりである。

【0038】

HUVECsを以下のようにしてDHMEQで前処理した。すなわち、メタノールで希釈したDHMEQを、HUVECsを培養している培養液の中にデータに示す濃度になるよう、培養液量の1 %量を添加し37℃、5 % CO₂で2時間インキュベートした。

【0039】

メタノールで希釈したDHMEQを、HUVECsを培養している培養液中にデータに示す濃度になるよう培養液中の1 %量を添加し、37℃、5 %CO₂の状態では2hインキュベートした。

【0040】

DHMEQを2時間前処理したHUVECsと無処理のHUVECsをそれぞれ10 ng/ml TNF- α 、10 ng/ml IL-1 β 、10 μ g/ml LPSで刺激し（すなわち、それぞれの培養液中に添加し、データに示す時間(0、5、10、30min、etc)、37℃、5 % CO₂でインキュベートした。）、細胞をサンプリングした。集めた細胞を400 μ lのbuffer A (10mM HEPES : pH 7.9、1.5 mM DTT、0.1 mM PMSF)で懸濁し、15分間静置した後15000×gで5分間遠心にかけて上清を除去した。再度400 μ lのbuffer Aを加え、15000×gで5分間遠心にかけて上清を除去した。次に、40 μ lのbuffer C (20 mM HEPES : pH 7.9、25 % glycerol、420 mM NaCl、1.5 mM MgCl₂、0.2 mM DTT、0.2 mM PMSF)を加え、指でタッピングして20分間静置した後、15000×gで5分間遠心にかけて上清を回収し、これを核抽出物とした。

4 μ lの合成オリゴヌクレオチド、2 μ lの γ -³²P-ATP、2 μ lの10×T4 PNK buffer(0.5 M Tris-HCl : pH 7.6、0.1 mM MgCl₂、50 mM DTT、1mM spermidine.HCl、1 mM EDTA)を混ぜ合わせ、蒸留水で全量18 μ lとした。さらに10 units/ μ lのT4 polynucleotide kinaseを2 μ l加え、37℃で10分間反応させた。反応後、TE buffer(10 mM Tris-HCl : pH 7.5、1mM EDTA)を80 μ l加え反応を止めた。これをNick columnで精製し、³²Pでラベルされた κ Bプローブを得た。

【0041】

5×binding buffer(375 mM NaCl、75 mM Tris-HCl : pH 7.0、7.5 mM EDTA、7.5 mM DTT、37.5 % glycerol、1.5 % NP-40、0.5 μ g/ml BSA)を4 μ l、1 μ g/ μ lに調整したpoly dI-dCを1 μ l、5 μ g分の核抽出物を加え全量が17 μ lになるように蒸留水を加えた。スーパーシフト用のサンプルにはさらに抗p65抗体を0.5 μ g分添加した。これに 32 Pでラベルされた κ Bプロンプを3 μ l加え、25 °Cで30分間インキュベートした。その後1時間あらかじめ電流を流しておいた4 % polyacrylamide gel(6.7 mM acrylamide (30/2)、1.25 ml 10×TBE buffer(0.9 M Tris-boric acid : pH 8.3、20 mM EDTA)、42 ml H₂O、500 μ l APS、50 μ l TEM ED)のウェルにこの20 μ lの反応液を移し150 Vで泳動した。泳動後、ゲルをろ紙に移し、ゲルドライヤーを用いて乾燥させ、それをフィルムに感光させた。

【0042】

[実施例 2]

Western blotting法により、TNF- α で刺激した時のICAM-1、VCAM-1、E-selectinの発現にDHMEQが与える影響を調べたところ、TNF- α 単独のとき ICAM-1、VCAM-1の発現は刺激後9 hでピークを迎え、E-selectinの発現は刺激後6 hでピークを迎えるが、図3に示すようにDHMEQを2 h前処理したHUVECsではそれら接着分子のいずれの発現も顕著に抑制された。実験方法は以下のとおりである。

【0043】

DHMEQを2時間前処理したHUVECsと無処理のHUVECsにそれぞれ10 ng/ml TNF- α で刺激し、細胞をサンプリングした。これにlysis buffer (20 mM Tris-HCl : pH 8.0、150 mM NaCl、2 mM EDTA、100 mM NaF、400 μ M Na₃VO₄、1 % NP-40、1 μ g/ml leupeptin、1 μ g/ml antipain、1mM PMSF)を加え、氷上で5分ごとに攪拌しながら30分間可溶化し、その後15000×gで10分間遠心にかけて上清を回収した。このlysateのタンパク質濃度をクマシーブリリアントブルー液で定量し、濃度を調整したあと3×SDS loading buffer(150 mM Tris-HCl : pH 6.8、30 % glycerol、3 % SDS、0.03 mg/ml bromophenol blue、150 μ l/ml 2-mercaptoethanol)を、加えたlysis bufferの半分量加え、5分間煮沸した。これをサンプルとし、12.5 % polyacrylamide gelを用いて電気泳動した。電気泳動後、ゲル内のタン

パク質をPVDF膜に転写し、5 % skim milkを含むTBS buffer(20 mM Tris-HCl : pH 7.6、137 mM NaCl)でブロッキングを行った。その後、ICAM-1、VCAM-1、E-selectinそれぞれの抗体を用いてPVDF膜と抗体反応をさせ、さらにそれぞれに適応する2次抗体と反応させた。そして、ECL法により発色させ、フィルムに感光させた。

【0044】

[実施例3]

図4に示すように白血球、HL-60細胞共にTNF- α 刺激後3、6、9 hの細胞接着数は時間依存的に増加したが、DHMEQを3 μ g/ml処理するとその接着は顕著に抑制された。この濃度のDHMEQはHUVECsに対して、毒性も増殖抑制も示さなかった。実験方法は以下のとおりである。

【0045】

24 well plateにHUVECsをまきconfluentに培養した。培地の組成は、9.8 g/l medium 199(ニッスイより供与), 1.8 g/l NaHCO₃(Wako), 10 ml/l 1 M HEPES buffer(Sigma), 30 mg/l ECGS(Becton Dickinson), 6 ml/l ヘパリンナトリウム注射液(武田薬品), 10 % heat-inactivated FBS(JRH)である。その後、以下の実験を行った。DHMEQを2時間前処理したHUVECsと無処理のHUVECsをそれぞれ10 ng/ml TNF- α で刺激し、刺激後0、3、6、9 hの白血球およびヒト急性前骨髄球性白血病株HL-60細胞のHUVECsに対する接着を評価した。今回、比重遠心分離法により分離した単核球を白血球として用いた。

【0046】

TNF- α で刺激後、wellをHBSS+で2回洗い、500 μ lのmedium (培地の組成: 9.8 g/l medium 199(ニッスイより供与), 1.8 g/l NaHCO₃(Wako), 10 ml/l 1 M HEPES buffer(Sigma), 30 mg/l ECGS(Becton Dickinson), 6 ml/l ヘパリンナトリウム注射液(武田薬品), 10 % heat-inactivated FBS(JRH))で培地交換を行い、白血球は 2.5×10^5 cells/well、HL-60細胞は 7×10^4 cells/wellになるようにwellに入れた。5 % CO₂、37 °Cで1時間インキュベートし、その後HBSS+で3回穏やかに洗い、その状態を写真にとってHUVECsに接着している細胞数を数えた。

【0047】

以上のように毒性、増殖抑制を示さずNF- κ Bの活性化を抑制し、HUVECsと白血球および白血球細胞の接着を抑制したという点で、このDHMEQは実験や臨床での長期使用が可能であり、有用であると考えられる。

【 0 0 4 8 】

【発明の効果】

NF- κ B阻害作用を有する化合物は、動脈硬化および癌の転移抑制に有効であることから、動脈硬化または癌の予防・治療剤として利用することができる。

【 0 0 4 9 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> KEIO UNIVERSITY

<120> AGENTS FOR PREVENTING AND/OR TREATING ARTERIOSCLEROSIS
OR CANCER

<130> P02-028

<140>

<141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 1

agttgagggg actttcccag gc

22

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 2

tcaactcccc tgaaagggtc cg

22

【 0 0 5 0 】

【配列表フリーテキスト】

【配列番号 1】

配列番号 1 は、実施例 1 で用いた合成オリゴヌクレオチドの塩基配列を示す。

【 0 0 5 1 】

【配列番号 2】

配列番号 2 は、実施例 1 で用いた合成オリゴヌクレオチドの塩基配列を示す。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

NF- κ B阻害作用を有する化合物が、動脈硬化および癌の転移を抑制する作用機構を説明する模式図である。

【図 2】

TNF- α で刺激した時のDHMEQによる阻害効果を示す。

【図 3】

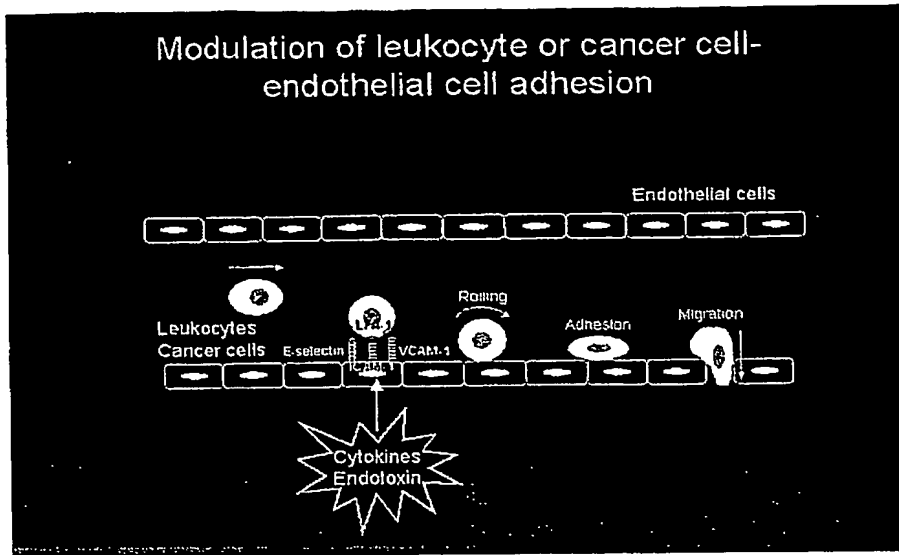
TNF- α で刺激した時のICAM-1、VCAM-1、E-selectinの発現をDHMEQが抑制した効果を示す。

【図 4】

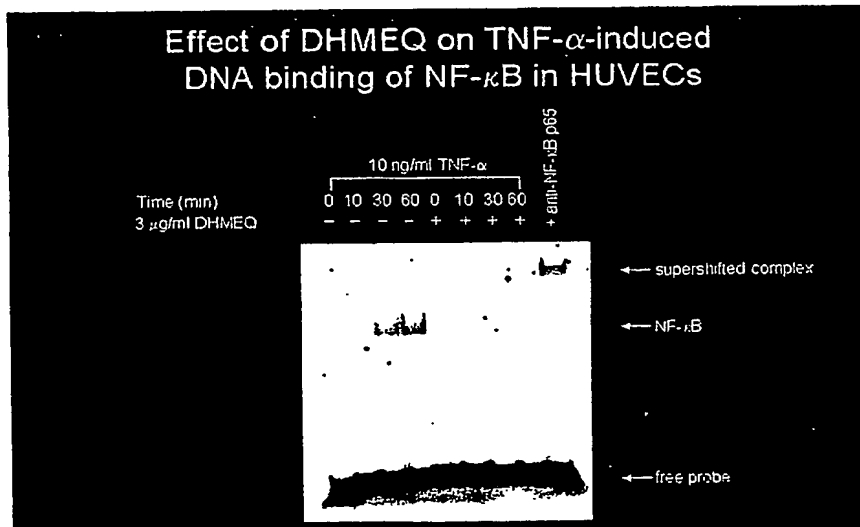
DHMEQが、HUVECsと白血球（上）またはHUVECsとHL-60細胞（下）の接着を抑制した効果を示す。

【書類名】 図面

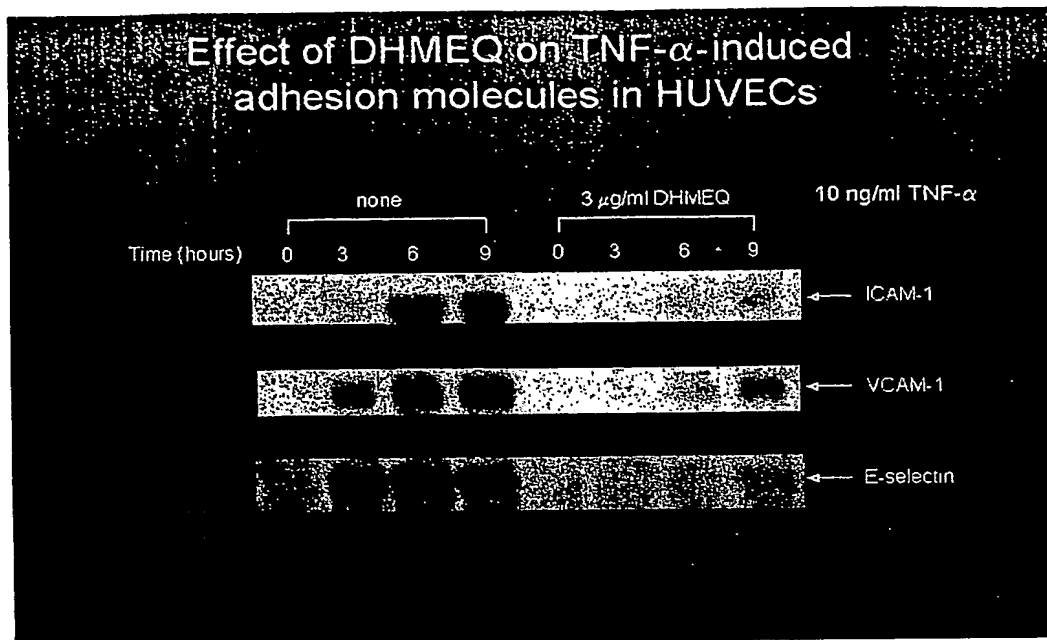
【図 1】



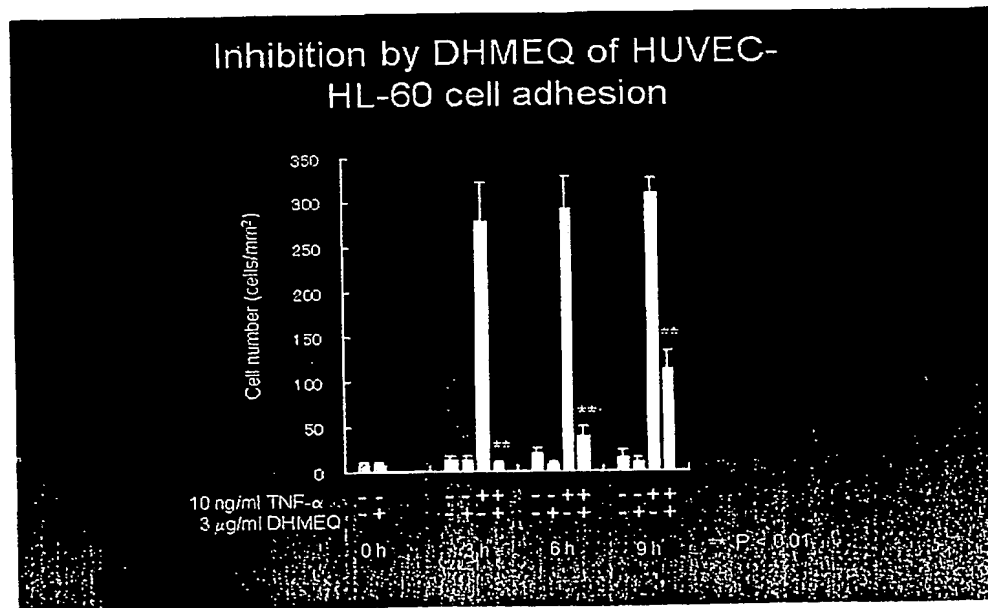
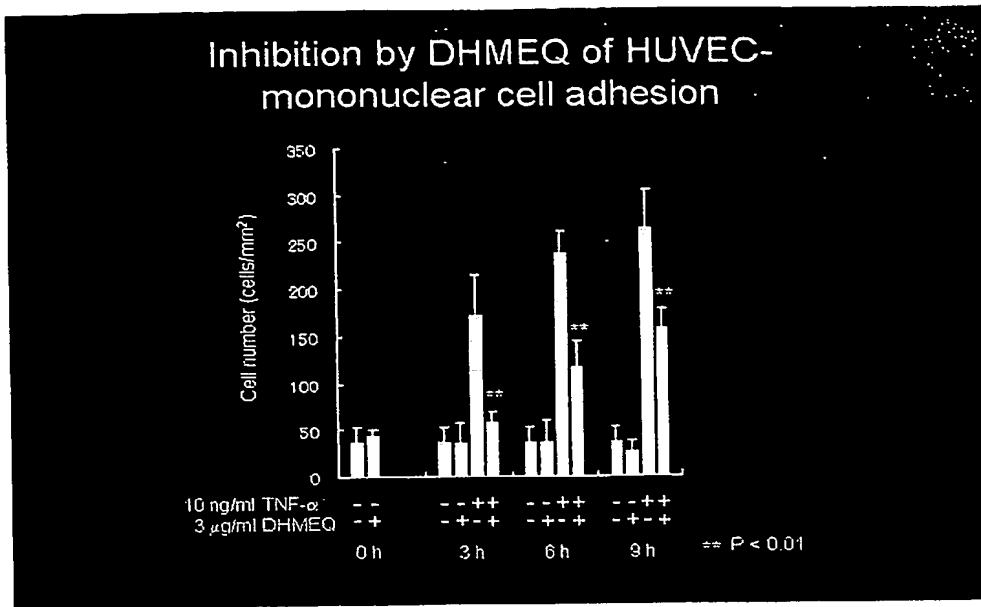
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 新規な動脈硬化治療剤および抗癌剤を提供すること。

【解決手段】 NF- κ B阻害作用を有する化合物を有効成分として含有する動脈硬化または癌の予防・治療剤。

【選択図】 図1

特願2002-185866

出願人履歴情報

識別番号

[899000079]

1. 変更年月日

1999年 9月17日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都港区三田2丁目15番45号

氏 名

学校法人慶應義塾